

Caracterización e identificación de bacterias antárticas productoras de ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega-3

Bianchi, A.^{1,2}, Olazabal, L.², Torre, A.², Loperena, L.¹.

1-Inst. Ing. Química – Facultad de Ingeniería Universidad de la República – Depto. de Bioingeniería

2- Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - E-mail: a.clara.bianchi@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son lípidos con un rol esencial en la salud humana y animal. Numerosas investigaciones avalan sus efectos benéficos, siendo los más importantes los de tipo omega 3 (ácido eicosapentaenoico, EPA, y docosahexaenoico, DHA) y omega 6 (ácido linoleico). Dichos ácidos no pueden ser sintetizados por los animales superiores, siendo en la actualidad las fuentes principales los peces y el krill antártico. Encontrar fuentes alternativas para la obtención de AGPI significaría disminuir la extracción de estos recursos marinos gravemente amenazados por su sobre explotación. Estudios desarrollados en bacterias psicrófilas de origen marino provenientes de la Antártida han demostrado que una alta proporción de sus ácidos grasos son poliinsaturados y que poseen la propiedad de síntesis de EPA y/o DHA como estrategia de adaptación a las condiciones extremas de dicho ecosistema.

Tabla 1. Evaluación cualitativa de la producción de EPA

Cepa11	Microorganismo con mayor similitud (% de similitud) con el banco de datos del NCBI	Medio líquido PYM + TTC		
		4°C	10°C	15°C
1-4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSw20441(99%)	+++	+++	++
1-6	<i>Pibocella ponti</i> SE9(99%)	+++	+++	NC
2-6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. IC2-76(99%)	+++	+++	+++
3-3	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A(99%)	+++	+++	++
3-7	<i>Zobellia laminariae</i> KOPRI_22206(99%)	++	++	-
3-9	<i>Granulosicoccus antarcticus</i> IMCC3135(99%)	+++	+++	+++
3-10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CI4(99%)	+++	+++	+++
4-2	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> CIP_105339(99%)	+++	+++	+++
5-1	<i>Flavobacterium frigidarium</i> S3-9 (98%)	+	+++	+++
7-1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PSB-8(99%)	+++	+++	++
7-6	<i>Colwellia</i> sp. E4-4(97%)	++	NC	NC
7-8	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> CIP_105339(99%)	+++	+++	+++
7-9	<i>Pibocella ponti</i> SE9(99%)	+++	+++	+
7-10	<i>Donghaeana dokdonensis</i> KOPRI_22265(99%)	NC	+	NC
8-2	<i>Cellulophaga fucicola</i> NN015860(98%)	+++	+++	+++
8-2'	<i>Winogradskyella</i> sp. gap-f-41(97%)	++	+	-
8-3	<i>Colwellia</i> sp. IE7-5(99%)	++	+	NC
8-5	<i>Shewanella livingstonensis</i> KOPRI22225(95%)	+++	+++	+++
8-6	<i>Cellulophaga fucicola</i> NN015860(98%)	+++	+++	+++
9-1	<i>Cellulophaga fucicola</i> NN015860(98%)	+++	+++	+++
9-2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. S-1(99%)	+++	+++	+++
10-1	<i>Zobellia laminariae</i> KOPRI_22206(99%)	+++	+++	+++
11-5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A (99%)	++	+++	+
12-3	<i>Cellulophaga fucicola</i> NN015860(98%)	+++	+++	+++
2A	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSw20447(99%)	+++	+++	+++
2B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A(99%)	+++	+++	+++
3A	<i>Psychromonas arctica</i> KOPRI_22215(99%)	++	+	+
4B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A(99%)	+++	+++	++
5A	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A(99%)	+++	+++	+++
5D	<i>Polaribacter glomeratus</i> KOPRI_22229(99%)	NC	++	++
8A	<i>Psychrobacter</i> sp. ice-oil-471(99%)	+++	+++	++
9A	<i>Alteromonas</i> sp. KT1102(98%)	+	+	+
9C	<i>Psychroserepens mesophilus</i> KOPRI22160(98%)	+++	+++	++
9D	<i>Cellulophaga algicola</i> KOPRI_22183(99%)	++	+++	+++
11A	<i>Planococcus</i> sp. Zao-A(99%)	+++	++	+
11B	<i>Cellulophaga algicola</i> KOPRI_22183(99%)	+++	+++	+
14-B	<i>Flavobacterium frigidarium</i> S3-9(98%)	+	+++	+
14-E	<i>Flavobacterium frigidarium</i> S3-9(98%)	+	++	+++
15-C	<i>Cellulophaga fucicola</i> NN015860(98%)	+++	+++	+++
15-E	<i>Polaribacter glomeratus</i> KOPRI22229(99%)	+++	+++	+++

nc: no creció; +: naranja; ++: rojo tenue; +++: rojo intenso.

RESULTADOS

Según características fenotípicas y el análisis filogenético, las cepas aisladas pertenecen a los géneros: *Pseudoalteromonas*, *Zobellia*, *Colwellia*, *Granulosicoccus*, *Flavobacterium*, *Donghaeana*, *Cellulophaga*, *Planococcus*, *Winogradskyella*, *Psychromonas*, *Pibocella*, *Polaribacter*, *Psychrobacter*, *Alteromonas*, *Shewanella* y *Psychroserepens*. Por GC-MS se encontraron 4 cepas productoras de EPA de los géneros *Shewanella*, *Cellulophaga*, *Polaribacter* y *Pibocella* y 2 cepas productoras de DHA de los géneros *Colwellia* y *Pseudoalteromonas*. Siendo sólo cepas de los géneros *Shewanella* y *Colwellia* reportados por otros autores como productores de EPA y/o DHA.

Se encontraron 38 clones de bacilos Gram negativos que fueron capaces de reducir el TTC a TF (Tabla 1), lo cual indicaría que el 95% de las bacterias marinas antárticas aisladas serían productoras de EPA según Ryan et al. De las 10 cepas elegidas como mejores productoras de EPA según el método del TTC, solo 4 se verificaron como productoras cuando se analizaron por GC-MS (Tabla 2), indicando que dicho método, propuesto para el "screening" de nuevas bacterias productoras de EPA no es específico.

OBJETIVO

Evaluar la capacidad de producción de EPA de 40 cepas bacterianas de origen marino provenientes de la Antártida.

Tabla 2. Evaluación cuantitativa de la producción de EPA y DHA

Cepa	EPA mg/g biomasa	DHA mg/g biomasa	Límite de detección mg EPA o DHA/g biomasa
8-5	1,69 ± 0,15	0	0,24
8-3	0	0,01 ± 2,00x10 ⁻³	6,00 x 10 ⁻⁴
9-1	0	0	---
9D	0,69 ± 0,29	0	0,08
9-2	-	0	---
7-1	0	0,08 ± 9,10x10 ⁻³	0,04
9C	0	-	---
5-1	0	0	---
15E	0,15 ± 0,08	0	4,00 x 10 ⁻³
7-9	0,50 ± 0,01	0	1,00 x 10 ⁻³

(-)no se obtuvieron duplicados. (±) desviación estándar de duplicados

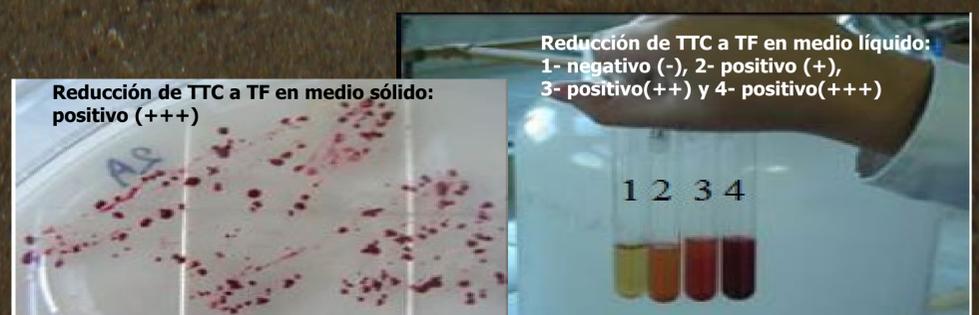
MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas fueron recuperadas de cultivos stock a -70°C y se propagaron en medio Agar Marino (AM) 2216 a 4°C. La identificación se realizó por secuenciación del ADNr 16S.

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados se evaluó:

1) por el método de reducción del "2,3,5-triphenyltetrazolium chloride" (TTC) mediante la incorporación de TTC al medio líquido "Peptone-Yeast extract-Meat extract" (PYM). Las bacterias productoras de EPA son capaces de reducir este compuesto a "triphenyl formazan" (TF) identificándose por la aparición del color rojo en el cultivo (Ryan, J., et al. A rapid method for the isolation of eicosapentaenoic acid-producing marine bacteria, 2010. J. Microbiol. Methods 82 (1), 49-53).

2) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los lípidos se extrajeron de acuerdo a el método de Burja. (Burja A.M., et al. 2007. Evaluation og Fatty Acid Extraction Methods for Thraustochytrium sp. ONC-T18. J. Agricultural and Food Chemistry 55,4795-4801). Los esteres metílicos de los ácidos grasos se generaron siguiendo los métodos de la AOCS Ce 2-66 y Ch 91 y la determinación del perfil de ácidos grasos por GC-MS de acuerdo con el método AOCS Ce 1-62.



Se agradece el apoyo al Instituto Antártico Uruguayo